**3 урок.**

**Основы спектрофотометрии.**

Методы спектрофотометрии — методы исследования и анализа веществ, основанные на поглощении молекулами вещества монохроматического электромагнитного излучения в ультрафиолетовой (УФ), видимой и инфракрасной (ИК) областях спектра. Природа полос поглощения в УФ и видимой областях спектра связана с различными электронными переходами в поглощающих молекулах и ионах (электронные спектры). В ИК-области она связана с колебательными переходами и изменением колебательных состояний ядер, входящих в молекулу поглощающего вещества (колебательные спектры).

В случае поглощения веществами немонохроматического излучения выделяют фотоколориметрические (колориметрические) методы анализа. Фотоколориметрия отличается от спектрофотометрического анализа тем, что анализируемое вещество с помощью какого-либо реагента переводят (количественно) в окрашенное соединение. Вначале получают окрашенные растворы, используя растворы стандартных образцов. Затем строят градуировочный график зависимости интенсивности поглощения окрашенных растворов от концентрации стандартного раствора, по графику рассчитывают содержание вещества в испытуемых образцах.

Метод абсолютной спектрофотометрии (фотоколориметрии) основан на измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно раствора сравнения, в качестве которого может использоваться чистый растворитель или раствор, содержащий все компоненты анализируемого раствора, кроме определяемого вещества.

Метод дифференциальной спектрофотометрии (фотоколориметрии) основан на измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно раствора сравнения, содержащего определенное количество стандартного образца испытуемого вещества или его заменителя. Такой прием приводит к изменению рабочей области шкалы прибора и снижению относительной погрешности определения до ±(0,5–1) %, т. е. сопоставимой с титриметрическими методами. Спектрофотометрические и фотоколориметрические методы анализа основаны на использовании объединенного закона Бугера — Ламберта — Бера:



где I0 — интенсивность излучения, падающего на вещество; I — интенсивность излучения, прошедшего через вещество; А — оптическая плотность, поглощение; k — показатель поглощения данного вещества (молярный показатель поглощения ε или удельный показатель поглощения , используемый в фармацевтическом анализе); С — концентрация раствора анализируемого вещества, моль/л; ℓ — длина рабочего слоя кюветы, см.

Удельный показатель поглощения (ε) является спектрофотометрической константой для каждого вещества, не зависящей от концентрации, и представляет собой величину оптической плотности раствора, содержащего 1,0 г вещества в 100 cм3 раствора, измеренную в кювете с рабочей длиной 1 см:



Установив по стандартному образцу величину и преобразовав эту формулу, можно рассчитать концентрацию анализируемого вещества с относительной погрешностью до ±2 %:



В случае отклонений от закона Бугера — Ламберта — Бера вначале с помощью стандартных растворов устанавливают зависимость оптической плотности от концентрации и строят градуировочный график, а затем по нему определяют содержание определяемого вещества в анализируемом растворе.

Закон Бугера – Ламберта – Бера отражает линейную зависимость оптической плотности А от концентрации С при постоянной толщине поглощающего слоя *l* (закон Бера) и, наоборот, зависимость А от *l* при постоянной С (закон Бугера – Ламберта).

Во втором случае зависимость является правилом, из которого нет исключений.

Зависимость А от С при постоянном значении *l* в идеале должна носить линейный характер.



Зависимость оптической плотности вещества А от концентрации С

при соблюдении основного закона светопоглощения.

При выполнении закона Бера график зависимости оптической плотности от концентрации представляет собой прямую, проходящую через начало координат, а функция *А* = f(*λ*), графическая зависимость которой называется спектром поглощения, имеет один и тот же вид, независимо от толщины слоя и концентрации раствора, и положение максимума поглощения сохраняется.

***Выбор оптимальных условий проведения фотометрических определений***

Для проведения фотометрической реакции определяемый компонент переводят в соединение, обладающее значительным поглощением. Чаще всего его связывают в комплексное соединение.

При использовании фотометрического титрования применяют те же реакции, что и в обычных методах, однако о содержании вещества судят не по интенсивности поглощения, а по количеству затраченного титранта.

Условия проведения фотометрических реакций должны быть предварительно тщательно изучены.

Предварительное изучение рабочих условий включает:

1. Выбор длины волны.

В спектрофотометрах рекомендуется проводить измерения при длине волны λ, соответствующей максимальному значению *А* (λmax).

Для этого строится зависимость *А* от λ (снимается спектр поглощения) по всей длине шкалы, для работы выбирается длина волны, при которой поглощение максимально.

2. Расчет молярного коэффициента поглощения *ε*.

В основе расчета – соблюдение основного закона светопоглощения. Расчет проводят по формуле

*А = ε* ·*l* · *C.*

Измеряют оптическую плотность раствора одной концентрации в кюветах разной толщины и строят график зависимости *А* от *l.* Прямолинейность графика указывает на соблюдение закона Бугера – Ламберта.

Интервал соблюдения закона Бера определяет прямолинейная зависимость *А* от *С*. Для этого при постоянном значении *l* измеряют оптические плотности серии растворов с различными концентрациями.

Для расчета *ε* измеряют оптическую плотность раствора известной концентрации в кювете определенной толщины. В фотометрическом анализе предпочтение отдается методам, имеющим большее значение *ε*.

3. Изучение влияния посторонних факторов на оптическую плотность (природа растворителя, рН раствора, температура, присутствие посторонних компонентов и др.).

4. Выбор оптимальной величины *l* (выбор кюветы).

Сначала кювету подбирают на глаз по окраске раствора. Если раствор слабо окрашен, то используют кюветы толщиной от 2 до 10 см. Если окраска раствора достаточно интенсивная, пользуются кюветами менее 1 см. Практически поступают следующим образом: в кювету наливают раствор средней концентрации из эталонного ряда и измеряют оптическую плотность, которая должна находиться в интервале от 0,4 до 0,6 (в этом случае погрешность измерения минимальна). Если *А* больше этих значений, то следует взять кювету с меньшим значением *l*. Если *А* меньше, чем 0,4–0,6, то нужно использовать кювету большей толщины. На практике чаще всего используются кюветы толщиной 1 см.

5. Выбор раствора сравнения.

В качестве раствора сравнения в зависимости от условий чаще всего используют:

– растворитель;

– раствор реагента, если он сам поглощает излучение;

– раствор холостого опыта (содержит все компоненты, кроме определяемого);

– раствор анализируемого объекта.

7. Расчет пределов обнаружения и определения минимальной и максимальной концентрации данного компонента. Это надежно устанавливается лишь с использованием методов математической статистики.

Спектрофотометрия в фармацетическом анализе

Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях — один из наиболее широко используемых физико-химических методов в фармацевтическом анализе (ОФС 42-0042-07 ГФ РФ XII). Анализируемые ЛВ должны иметь в структуре молекулы хромофорные группы (сопряженные связи, ароматическое ядро и др.), обусловливающие различные электронные переходы в молекулах и поглощение электромагнитного излучения.

Идентификацию ЛВ можно провести по характеру спектров поглощения в различных растворителях, положению максимумов и минимумов поглощения или по их отношению (при различных длинах волн). Спектр поглощения вещества является его специфической характеристикой и представляет собой кривую зависимости интенсивности поглощения (оптической плотности) от длины волны (l, нм).

Для количественного спектрофотометрического анализа важен выбор аналитической полосы поглощения. Последняя должна быть свободна от наложения полос поглощения других компонентов смеси и иметь достаточно высокий удельный показатель поглощения анализируемого вещества.

Одним из вариантов дифференциальной спектрофотометрии является производная УФ-спектрофотометрия. Если в дифференциальной спектрофотометрии используют разность оптических плотностей при одной и той же длине волны, то в производной — при двух длинах волн в небольшом интервале. Этот вариант позволяет выделять индивидуальные полосы в «сложном» УФ-спектре, представляющем собой сумму налагающихся полос поглощения или полос, не имеющих четко выраженного максимума. При этом на спектральных кривых в координатах производная — длина волны (∆I – λ) появляются полосы с отчетливо выраженными максимумами и минимумами. Благодаря этому можно идентифицировать сходные по химической структуре вещества, повысить избирательность анализа и выполнять количественное определение двух-, трехкомпонентных смесей более экономично и эффективно, чем титриметрическими методами.

Другим вариантом дифференциальной спектрофотометрии является АЕ-метод, основанный на превращении одного из веществ, входящих в состав анализируемой пробы, в таутомерную (или иную) форму, отличающуюся по характеру и интенсивности поглощения. Затем измеряют оптическую плотность раствора одной таутомерной формы по отношению к другой, т. е. используют в качестве раствора сравнения раствор исходного определяемого вещества.

Для измерения оптической плотности и регистрации спектров поглощения применяют спектрофотометры — приборы, позволяющие проводить анализ как окрашенных, так и бесцветных соединений по избирательному поглощению монохроматического излучения в видимой, УФ- и ИК-области спектра. Сегодня на рынке имеется большое разнообразие спектрофотометров различных производителей. Сконструированы спектрофотометры, работающие в различных областях спектра, например, только в УФ- или только в ИК-области, в УФ- и видимом диапазоне. Существуют приборы, работающие во всех диапазонах, что позволяет на одном и том же оборудовании проводить различные исследования. Современная аппаратура дает возможность измерять УФ‑спектры в области от 190 до 380 нм, видимые спектры — от 380 до 780 нм, ИК‑­спектры — от 780 до 40000 нм (40 мкм).

Оптическая схема спектрофотометра приведена на рис.



В качестве источника излучения (1) используют водородные, дейтериевые, ртутно-кварцевые, натриевые, а также ксеноновые лампы. Монохроматор (5) — стеклянная или кварцевая призма, дифракционная решетка — служит для получения монохроматического света. Фотоэлемент (8) превращает энергию падающего света в электрический ток, а усилитель позволяет получить сигнал, который распознается детектором (9). Детектор преобразует сигнал в конкретные числовые значения. Важной деталью прибора является кювета (7), к которой предъявляют особые требования. Допустимые отклонения в толщине слоя используемых кювет должны быть не более ±0,005 см. Кюветы, предназначенные для испытуемого раствора и раствора сравнения, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

Преимущества использования спектрофотомерии в фармацевтическом анализе:

• высокая чувствительность (многие современные лекарственные средства крайне трудно проанализировать химическими методами из-за малых содержаний действующего вещества);

• воспроизводимость;

возможность анализа ЛВ, не дающих химические реакции в стехиометрическом соотношении (например, рутин);

• возможность анализа многокомпонентных ЛФ, для которых нет методик количественного определения химическими методами (например, комплексные витаминные препараты, содержащие пиродоксин, рибофлавин и никотинамид);

• возможность сочетания с другими методами, например, с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), где спектрофотометр используется как детектор (такое сочетание методов позволяет проводить качественный и количественный анализ с высокой точностью при наличии большого количества веществ в смеси с близкими физико-химическими свойствами).